

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.014

Notch1-核转录因子 κ B 在三阴乳腺癌组织中的表达及临床意义*

覃舒婷,莫军扬,张敏敏,唐 茜

(广西壮族自治区柳州市人民医院普外三科 545005)

[摘要] **目的** 探讨 Notch1-核转录因子 κ B(Notch1-NF κ B)在三阴乳腺癌(TNBC)组织中的表达及临床意义。**方法** 收集 2013 年 6 月至 2014 年 12 月住院的 TNBC 患者(乳腺癌组, $n=66$)和乳腺良性肿瘤患者(良性肿瘤组, $n=62$)乳腺组织标本,免疫组织化学法和 Western blot 法检测组织中 Notch1-NF κ B 的表达。酶联免疫吸附试验法检测不同病理学特征的 TNBC 患者乳腺组织中 Notch1-NF κ B 水平。**结果** 免疫组织化学显示,Notch1-NF κ B 在乳腺癌组乳腺组织中呈高表达,在良性肿瘤组中呈微弱表达。Western blot 示 Notch1-NF κ B 在乳腺癌组中蛋白定量显著高于良性肿瘤组($P<0.05$)。66 例 TNBC 乳腺组织病理学分级和 TNM 分期不同,Notch1-NF κ B 水平均有差异,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Notch1-NF κ B 在 TNBC 患者乳腺组织中高表达,其水平与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。

[关键词] 乳腺肿瘤;免疫组织化学;转录因子;三阴乳腺癌;Notch1;核转录因子 κ B

[中图分类号] R655.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2075-03

The expression and clinical value of Notch1-nuclear regulatory factor κ B in human triple-negative breast cancer*

Qin Shuting, Mo Junyang, Zhang Minmin, Tang Qian

(Department of the 3rd General Surgery, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou, the Guangxi Zhuang Autonomous Region 545005, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression and clinical value of Notch1-nuclear regulatory factor κ B(Notch1-NF κ B) in human triple-negative breast cancer(TNBC). **Methods** A total of 66 breast cancer patients and 62 breast benign tumor patients from general surgery department were included in this study. Immunohistochemical stain and Western-blot were employed to detect the expression of Notch1-NF κ B in mammary tissue of all patients. ELISA was used to detect Notch1-NF κ B content in mammary gland tissue of TNBC those of different pathological features. **Results** Immunohistochemical stain showed that Notch1-NF κ B was highly expressed in mammary gland tissues of TNBC and weakly expressed in benign tumor patients. Western-blot results showed the Notch1-NF κ B protein level significantly increased in mammary gland tissues of TNBC patients compared with those with benign tumor($P<0.05$). The expression of Notch1-NF- κ B was significantly associated with TNM stage and histological grade($P<0.05$). **Conclusion** Notch1-NF κ B was highly expressed in mammary gland tissue of TNBC patients, and their expressions were closely related with the occurrence, development and metastasis of TNBC.

[Key words] breast neoplasms; immunohistochemistry; transcription factors; triple-negative breast cancer; Notch1; nuclear regulatory factor κ B

Notch1 是 Notch 基因编码的蛋白家族成员之一,激活后可使正常细胞向恶性细胞转化。多项研究表明 Notch1 影响了乳腺癌的形成和预后^[1-2]。核转录因子 κ B(NF- κ B)是一种具有多项调节功能的核转录因子,在细胞的增殖、分化和凋亡中起重要作用^[3],其活性受 Notch 信号通路的调控^[2]。目前,已有研究发现抑制 Notch1-NF κ B 活性可以降低三阴乳腺癌(triple-negative breast cancers, TNBC)细胞的生长速度^[4],但此项研究是在细胞株进行的,Notch1-NF κ B 在 TNBC 患者中的表达情况及临床意义,国内外研究甚少。本研究通过检测 TNBC 和乳腺良性肿瘤患者的乳腺组织中 Notch1-NF κ B 表达及其与肿瘤分级、分期、淋巴结转移的关系,分析 Notch1-NF κ B 表达在 TNBC 中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 6 月至 2014 年 12 月广西柳州市第一人民医院普外三科收治的 TNBC 患者 66 例为乳腺癌组,女性,年龄 26~78 岁,平均(48.6±12.9)岁。同期收治的良性乳腺肿瘤患者 62 例为良性肿瘤组,女性,年龄 22~67 岁,平均(43.1±9.2)岁。收集石蜡标本用于免疫组织化学,收集

术中乳腺组织(取自病变非坏死部位,液氮速冻, -80 °C 保存)用于 Western blot 和酶联免疫吸附试验(ELISA)测定。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 Notch1 一抗和兔抗人 NF- κ B 一抗购自美国 Cell Signaling;BCA 蛋白定量盒购自美国 Thermo 公司;Notch1 和 NF- κ B 水平检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司;羊抗兔二抗、多聚甲醛、石蜡、柠檬酸缓冲液和苏木素购自北京中杉金桥生物技术公司;酶标仪产自芬兰 Thermo 公司。

1.2.2 试验方法 NF- κ B 是由一系列相关蛋白组成,最常见的 NF- κ B 二聚体为 p65/p50,磷酸化的 p65(phospho-NF- κ B p65)是 p65 的活性形式。因此,本试验中均以 phospho-NF- κ B p65 的检测结果代表 NF- κ B 水平。

1.2.2.1 免疫组织化学检测乳腺组织 Notch1-NF κ B 表达 采用免疫组织化学 SP 法检测,具体步骤按照试剂盒说明书操作。细胞膜和(或)胞膜质和(或)细胞核出现黄色或棕黄色颗

* 基金项目:柳州市科学技术局(2014J030408)。 作者简介:覃舒婷(1983-),主治医师,硕士,主要从事研究乳腺癌的综合治疗。

粒为阳性反应。

1.2.2.2 Western blot 检测乳腺组织 Notch1 和 phospho-NF- κ B p65 表达 取约 200 mg 组织剪碎,加入裂解液,冰上研磨,超声波破碎,4℃离心,转速 10 000 r/min,时间 20 min。BCA 法蛋白定量,取 60 μ g 蛋白与 5 \times 加样缓冲液混匀,100℃变性 5 min,冷却后上样。恒压电泳 2 h,4℃下将样品转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。加入兔抗人 Notch1 一抗(1:500)和 phospho-NF- κ B p65 一抗(1:500),4℃过夜,TBST 洗涤 3 次,加入羊抗兔二抗(1:3 000),室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次。加入化学发光液显色。

1.2.2.3 ELISA 检测乳腺组织 Notch1 和 NF- κ B 水平 将冻存标本置于 2~8℃,直至融化。加入磷酸盐缓冲液(PBS),匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 min 后收集上清液。BCA 法蛋白定量后按照说明书操作,主要步骤为:加样、温育、配液、洗涤、加酶、显色、终止反应、测定吸光度。以标准物的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,根据标准曲线计算相应的浓度。

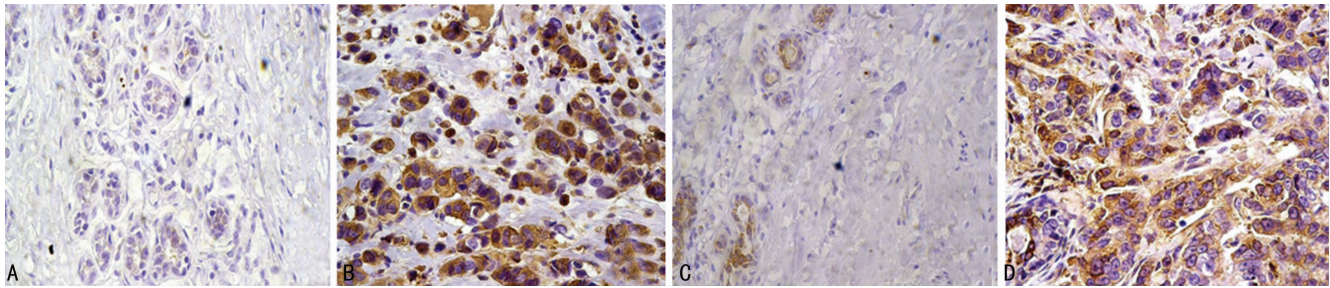
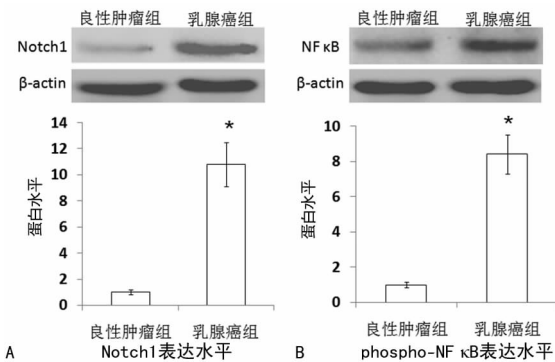


图 1 Notch1 和 NF- κ B 在乳腺组织中的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

2.2 两组患者乳腺组织中 Notch1 和 NF- κ B 蛋白表达差异 与良性肿瘤组比较,乳腺组患者乳腺组织 Notch1 蛋白和 phospho-NF- κ B p65 表达显著升高($P < 0.05$),见图 2。



良性肿瘤组 Notch1 或 NF- κ B p65 蛋白灰度值/ β -actin 蛋白灰度值设为 1。A:Notch1 在良性肿瘤和乳腺癌组织中的表达。B:phospho-NF- κ B p65 在良性肿瘤和乳腺癌组织中的表达。*: $P < 0.05$,与良性乳腺癌组比较。

图 2 Notch1 和 phospho-NF- κ B p65 在乳腺组织中蛋白表达

2.3 TNBC 患者乳腺组织中 Notch1-NF κ B 水平与临床病理特征的关系 发生淋巴结转移的患者,乳腺病变组织中 Notch1 水平显著高于无淋巴结转移者,但和 NF- κ B 水平二者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。病理学分级和 TNM 分期不同,Notch1-NF κ B 水平均有差异,两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者乳腺组织中 Notch1 和 NF- κ B 表达差异 在良性肿瘤组的乳腺组织中,Notch1 和 NF- κ B 均呈微弱表达(图 1A、C),Notch1 和 NF- κ B 阳性表达率分别为 21%和 16%。而乳腺癌组患者的癌变组织中,可见棕褐色颗粒沉积于细胞膜和细胞质,呈 Notch1 高表达(图 1B),阳性表达率 79%;棕黄色颗粒沉积于细胞质和细胞核,呈 NF- κ B 阳性表达(图 1D),阳性表达率 70%。Notch1 和 NF- κ B 在乳腺癌组织中表达的相关性:14 例 Notch1 阴性表达病例中 NF- κ B 阳性表达 4 例,52 例 Notch1 阳性表达病例中 NF- κ B 阳性表达 39 例,Spearman 相关性分析显示,Notch1 与 NF- κ B 呈显著正相关($r = 0.398, P = 0.01$)。

表 1 40 例 TNBC 患者 Notch1 和 NF- κ B 水平与临床病理的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n	Notch1(μ g/mg)	NF- κ B(pg/mg)
淋巴结转移			
有	29	6.1 \pm 0.67	32.4 \pm 2.99
无	37	4.0 \pm 0.56	29.2 \pm 3.10
病理学分级			
I	14	2.07 \pm 0.29	28.7 \pm 2.87
II	24	3.02 \pm 0.42	32.8 \pm 4.00
III	28	3.79 \pm 0.35	36.9 \pm 5.21
TNM 分期			
I	26	1.64 \pm 0.26	31.7 \pm 4.56
II	23	2.10 \pm 0.25	34.6 \pm 4.23
III	17	2.94 \pm 0.32	36.9 \pm 5.12

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率在女性肿瘤中占据首位^[5]。TNBC 约占所有乳腺癌病理类型的 15%^[6],因其复发率、转移率和病死率高,预后差等特点^[7],成为近年来研究热点。由于 TNBC 患者雌、孕激素受体均为阴性,失去了内分泌治疗的机会,目前,临床亦无治疗 TNBC 的特异性药物。因此,了解其发病机制从而寻找新的治疗靶点是 TNBC 研究亟待解决的问题。近年来,有研究发现 Notch1-NF κ B 参与了

TNBC 的形成^[4,8],但 Notch1-NF- κ B 活性与 TNBC 患者临床病理学特点之间的关系还不明确。

Notch 信号途径是一条高度保守的信号通路,广泛表达于哺乳动物的多种成熟组织中^[9]。大量的研究证实,Notch 信号对乳腺肿瘤的发生具有重要调控作用,在不同的组织细胞中被激活后,可表现为致瘤性^[10],也可表现为抑瘤性^[11]。其中,多数研究认为 Notch1 在多种恶性肿瘤中有促癌作用^[12-13]。本研究应用免疫组织化学和 Western blot 方法,分别从形态学和蛋白定量分析两方面观察到:TNBC 患者乳腺组织中的 Notch1 表达显著高于良性乳腺肿瘤患者,这与既往的研究结果一致。为了研究 Notch1 的表达强弱与患者临床病理特征之间的关系,本研究应用 ELISA 测定了乳腺组织中 Notch1 的水平,发现发生淋巴结转移的患者,乳腺组织中 Notch1 的水平显著高于未发生淋巴结转移者。随着肿瘤病理学分级和 TNM 分期级别的升高,Notch1 水平的增加差异有统计学意义。以上结果提示:Notch1 不仅参与了 TNBC 肿瘤的形成,而且其表达与患者病情严重程度(淋巴结转移、病理学分级、TNM 分期)具有一致性。

NF- κ B,在胚胎发育、淋巴细胞的差异性凋亡、免疫和炎症反应中起重要作用^[14-15]。其活性可受 Notch1 调节。在正常细胞内,NF- κ B 通常以无活性的前体形式(p50、p65、Rel B、c-Rel)存在于胞质中。Phospho-NF- κ B p65,作为 p65 的活性形式通常代表活化的 NF- κ B 水平。本研究将 TNBC 患者不同分级、分期和有无淋巴结转移等各因素之间进行乳腺组织 NF- κ B 水平的相互比较,结果提示 NF- κ B 在 TNBC 临床进展中有促进作用。

综上,Notch1 和 NF- κ B 在 TNBC 患者中明显高表达,Notch1-NF- κ B 通路的激活与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。因此,抑制 Notch1-NF- κ B 活性可能会成为 TNBC 治疗的一个新靶点,待进一步动物实验和临床研究的验证后,可为乳腺癌的控制或缓解提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Hao L, Rizzo P, Osipo C, et al. Notch-1 activates estrogen receptor-alpha-dependent transcription via IKKalpha in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2010, 29(2): 201-213.
- [2] D'altri T, Gonzalez J, Aifantis I, et al. Hes1 expression and CYLD repression are essential events downstream of Notch1 in T-cell leukemia[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(7): 1031-1036.
- [3] Metelev VG, Kubareva EA, Oretskaya TS. Regulation of activity of transcription factor NF- κ B by synthetic oligonucleotides[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78(8): 867-

878.

- [4] Pan H, Zhou W, He W, et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- κ B activity via the Notch-1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(2): 337-343.
- [5] Advani P, Moreno-Aspitia A. Current strategies for the prevention of breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2014, 6: 59-71.
- [6] 马静,魏素菊.三阴乳腺癌的最新治疗进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(19): 1234-1238.
- [7] Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, et al. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(2): 125-133.
- [8] Zhu H, Bhaijee F, Ishaq N, et al. Correlation of notch1, pAKT and nuclear NF- κ B expression in triple negative breast cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2013, 3(2): 230-239.
- [9] Bi P, Kuang S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(5): 248-255.
- [10] Speiser J, Foreman K, Drinka E, et al. Notch-1 and notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer [J]. *Int J Surg Pathol*, 2012, 20(2): 139-145.
- [11] Nosedá M, Chang L, Mclean G, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(20): 8813-8822.
- [12] Kunnimalaiyaan S, Sokolowski KM, Balamurugan M, et al. Xanthohumol inhibits Notch signaling and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127464.
- [13] Yao J, Zheng K, Li C, et al. Interference of notch1 inhibits the growth of glioma cancer cells by inducing cell autophagy and down-regulation of notch1-Hes-1 signaling pathway[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(6): 610.
- [14] Hoessel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(12): 86.
- [15] Didonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the Link between inflammation and cancer [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 379-400.

(收稿日期:2015-11-18 修回日期:2016-01-15)

(上接第 2074 页)

- [9] 王云雅,邓敬兰,王胜军,等.^{99m}Tc-MDP 骨闪烁显像骨外放射性异常浓聚原因分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(10): 1767-1769.
- [10] 付占立,张旭初,范岩,等.^{99m}Tc-MDP 全身骨显像诊断外伤性骨化性肌炎一例[J]. *中华核医学杂志*, 2007(4): 252.
- [11] 罗俊敏,朱剑峰,张鹏,等.全身骨显像骨外组织异常显影

的临床价值[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2008, 27(2): 52-53.

- [12] Lima MC, Passarelli MC, Dario V, et al. The use of spect/ct in the evaluation of heterotopic ossification in paraplegics[J]. *Acta Ortop Bras*, 2014, 22(1): 12-16.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-02-16)